



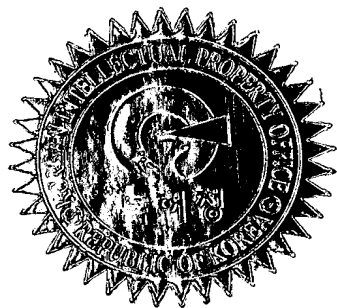
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0073433
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 11월 25일
Date of Application NOV 25, 2002

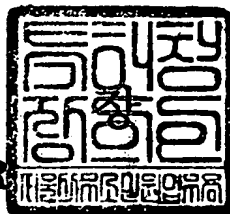
출원인 : 주식회사 태평양
Applicant(s) AMOREPACIFIC CORPORATION



2003 년 06 월 03 일

특 허 청

COMMISSIONER





1020020073433

출력 일자: 2003/6/4

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.11.25
【발명의 명칭】	폴리올 /고분자 마이크로캡슐 및 이를 이용한 효소 안정화 방법
【발명의 영문명칭】	Polyol/polymer microcapsule and the stabilization method of enzyme using it
【출원인】	
【명칭】	주식회사 태평양
【출원인코드】	1-1998-003983-5
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【포괄위임등록번호】	2001-033730-9
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	9-1998-000434-4
【포괄위임등록번호】	2001-033731-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	주희경
【성명의 영문표기】	JU,Hee Kyung
【주민등록번호】	770108-2030526
【우편번호】	132-746
【주소】	서울특별시 도봉구 쌍문4동 한양아파트 604동 210호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김진웅
【성명의 영문표기】	KIM,Jin Woong
【주민등록번호】	720228-1447011
【우편번호】	449-905



1020020073433

출력 일자: 2003/6/4

【주소】	경기도 용인시 기흥읍 상갈리 481번지 금화마을 주공아파트 309동 30 4호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	한상훈		
【성명의 영문표기】	HAN, Sang Hoon		
【주민등록번호】	661109-1392811		
【우편번호】	440-320		
【주소】	경기도 수원시 장안구 율전동 276-3 천록아파트 2동 203호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	장이섭		
【성명의 영문표기】	CHANG, Ih Seop		
【주민등록번호】	580910-1386711		
【우편번호】	449-846		
【주소】	경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 703 동보아파트 102동 1104호		
【국적】	KR		
【심사청구】	청구		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 윤동열 (인) 대리인 이선희 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	4	면	4,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	20	항	749,000 원
【합계】	782,000 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장[2001년 6월 11일자 포괄위임등록]_1통		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 효소를 폴리올계에서 근본적으로 안정화하고 이를 다시 고분자 마이크로캡슐로 궁극적으로 안정화하는 효소의 안정화 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 효소를 저분자량 폴리올에 균일하게 분산시켜 효소를 안정화시키는 단계; 상기 안정화된 효소/폴리올을 고분자 용액에서 재분산시킨 후 유화과정을 거쳐 에멀전을 수득하는 단계; 및 효소/폴리올/고분자 용액을 고화시켜 경질 고분자 마이크로캡슐로 회수하는 단계;를 포함한다.

【대표도】

도 3

【색인어】

효소 안정화*고분자 마이크로캡슐*폴리올

【명세서】**【발명의 명칭】**

폴리올/고분자 마이크로캡슐 및 이를 이용한 효소 안정화 방법 {Polyol/polymer microcapsule and the stabilization method of enzyme using it}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 폴리에틸렌글리콜(400 g/mol)/폴리카프로락톤 마이크로캡슐의 광학현미경 사진이다.

도 2는 폴리에틸렌글리콜 혼합비를 조절한 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐의 광학현미경 사진이다(400 g/mol : 8000 g/mol = 5:5 (w/w)).

도 3은 파파인 함유 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐의 광학현미경 사진이다.

도 4는 파파인 함유 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐의 주사전자현미경 사진이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<5> 본 발명은 제형에서의 사용시 안정성이 급격히 저하되는 특징을 지니는 효소를 효과적으로 안정화시킬 수 있는 고분자 마이크로캡슐의 제조 기술에 관한 것이다.

<6> 바이오산업의 발전과 더불어, 다양한 효소가 치료/치유제로 사용되고 있다.

그러나, 대부분의 효소는 매우 짧은 반감기를 지니고 있어, 궁극적인 효능 발현 이전에

변성되는 경향이 있으며, 효소 성분의 이러한 낮은 안정도는 그 활용가치를 저하시키는 가장 큰 요인이 되고 있다. 따라서, 이러한 효소 성분의 응용을 확대하기 위하여 최근 적절한 전달시스템의 구축에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 많은 효소 전달시스템 중에서 생분해성 고분자를 벽제로 활용한 연구는 장기 투여의 관점에서 많은 장점을 지니고 있다 (Y.Okawa, M. Yamamoto, H. Okada, T. Yashiki, T. Shimamoto, Chem. Pharmac. Bull. 5 (1988) 1095, H. Okada, Y. Doken, Y. Ogawa, H. Toguchi, Pharmac. Res. 11 (1994) 1143). 이러한 전달시스템 또한 제조 공정과 장기 보관의 관점에서는 안정도가 보장되어야 할 필요가 있다. 일반적으로 수-유-수 다중 에멀전 방법이 효소 함유 마이크로캡슐의 제조를 위하여 자주 사용되지만, 수-유 계면에서 효소의 활성이 저하된다는 면에서 큰 문제를 지니고 있다 (P. Couvreur, M. J. Blanco-Proeto, F. Puisieux, B. Ropues, E. Fattal, Adv. Drug Del. Rev. 28 (1997) 85, H. Sah, J. Pharmac. Sci. 88 (1999) 1320). 따라서, 최근에는 고체-유-수 에멀전 방법이 고체 상태에서 효소의 활성을 유지할 수 있다는 장점 때문에 보다 현실적으로 받아들여지고 있다 (T. Morita, Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, J. Control. Rel. 69 (2000) 435). 그러나, 상기의 고체 상태의 효소를 캡슐화하는 방법들은 대부분 가열과 물리적인 힘을 가하는 제조 공정상의 특징 때문에 효소의 많은 부분에서의 변성을 초래한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<7> 이에 본 발명자들은 종래의 이러한 효소의 변성을 막을 수 있는 안정화 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과 본 발명자들은 폴리올/고분자 마이크로캡슐이 효소의 안정화에 적합하다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

- <8> 본 발명의 목적은 저분자량 폴리올, 고분자량 폴리올 및 고분자 용액을 이용한 폴리올/고분자 마이크로캡슐을 제공하는 것이다.
- <9> 또한 본 발명의 목적은 저분자량 폴리올, 고분자량 폴리올 및 고분자 용액을 이용한 폴리올/고분자 마이크로캡슐의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- <10> 본 발명의 또다른 목적은 제약 또는 화장품 제형에 적용하기 위한 효소를 함유하는 효소 안정화 마이크로 캡슐 시스템을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <11> 본 발명의 저분자량 폴리올, 고분자량 폴리올 및 고분자 용액을 이용한 폴리올/고분자 마이크로캡슐의 제조 방법은 아래와 같다.
- <12> 먼저 저분자량 폴리올 및 고분자량 폴리올을 혼합하여 용매에 고분자 벽제를 용해하여 제조한 고분자 용액에 용해시킨다. 이 때 상기 저분자량 폴리올 및 고분자량 폴리올을 합한 중량과 고분자 용액의 고분자 벽제의 양은 벽제의 두께를 고려하며 조절 가능하다. 또한 상기 저분자량 폴리올 및 고분자량 폴리올을 합한 중량과 고분자 벽제의 양은 용매에 대하여 20 중량% 도입한다. 폴리올이 용해된 용액을 안정화제가 도입된 수용액에 넣고 호모게나이저를 이용하여 유화시킨다. 상기 유화액을 감압증발기에서 10~120분간 감압교반하여 용매를 완전 제거한 후의 분산액을 여과하여 캡슐을 회수하고 그 외 수용성 물질은 모두 제거한다. 회수된 상기 캡슐은 빛이 차단된 실온 감압 건조기에서 24~48 시간 동안 완전 건조한다.

- <13> 또한, 상기의 방법으로 제조된 폴리올/고분자 마이크로캡슐을 효소 또는 단백질 안정화 마이크로캡슐로 활용할 수 있으며, 나아가 이 기술을 다른 효소 응용 기술에도 도입하는 것이 가능하다.
- <14> 이를 위하여 효소가 내부 핵을 형성하고 이 효소는 소수성의 고분자량 폴리올에 의하여 코팅되어 있으며, 최종적으로 외각에 고분자가 벽체를 형성하는 구조를 지니고 있는 삼중 마이크로캡슐 구조가 가능하다.
- <15> 상기의 삼중 마이크로캡슐의 제조 방법을 다음과 같다.
- <16> 즉, 효소를 저분자량 폴리올에 균일하게 분산시키는 단계; 상기 안정화된 효소/폴리올을 고분자 용액에서 재분산 시킨 후 유화과정을 거쳐 에멀전을 수득하는 단계; 및 효소/폴리올/고분자 용액을 고화시켜 경질 고분자 마이크로캡슐로 회수하는 단계;를 포함한다.
- <17> 이하 본 제조 방법을 좀 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.
- <18> 먼저, 저분자량 폴리올에 효소를 분산시킨다. 일반적으로 효소는 저분자량 폴리올에 대하여 부분적인 용해력을 지니고 있다. 이 경우, 효소는 저분자량 폴리올상에서 비교적 높은 젖음성으로 인하여 구형 분산체를 형성하고 외각층만 부분적으로 용해되어 효소/폴리올 혼합상을 형성한다. 이 효소/폴리올 분산액을 고분자량 폴리올이 녹아 있는 고분자 용액에 이어 분산시킨다. 상기 고분자 용액은 고분자량 폴리올, 고분자 벽체(벽체용 고분자) 및 용매를 함유한다. 이러한 공정을 거쳐 저분자량 폴리올에 의하여 보호되는 효소상은 고분자 용액의 용매에 대하여 영향을 받지 않고 안정하게 분산될 수 있다. 상기 고분자량 폴리올은 최종 마이크로캡슐에서 효소와 소수성 고분자 벽체(벽체

용 고분자) 사이의 직접적인 접촉을 방지하는 완충작용을 한다. 이어지는 공정에선 효소/폴리올/고분자/용매로 구성되어 있는 액적에서 용매만 선택적으로 제거한다. 용매가 제거됨에 따라, 폴리올은 고분자에 대하여 비상용성을 지니고 있기 때문에, 상분리 현상이 발생한다. 이 상분리 과정에서 저분자량 폴리올은 높은 극성으로 인하여 약화된 외각 계면을 통하여 외수상으로 유출되고 마이크로캡슐 내부에는 고분자량 폴리올 상이 남게 된다. 결과적으로 마이크로캡슐은 효소가 내부 핵을 형성하고 이 효소는 고분자량 폴리올에 의하여 코팅되어 있고, 최종적으로는 외각에 고분자가 벽체를 형성하는 구조를 지니고 있는 삼중 마이크로캡슐 구조이다.

<19> 즉, 본 발명에서는 기존의 연구들이 제안하는 단순한 캡슐화에서 탈피하여 효소 자체의 구조적 특징을 그대로 유지하고 외부 자극과의 상호작용을 근본적으로 차단하기 위하여, 저분자량 폴리올을 마이크로캡슐의 내부 기공형성 템플레이트(template) 및 효소의 분산매로 사용하고, 동시에 고분자량 폴리올을 효소의 소수성 분배화제 및 벽체를 형성하는 고분자의 내벽에 의한 변성을 차단하는 차단제로 도입함으로써, 생분해성 고분자 마이크로캡슐 내에서 제조 공정과 보관 중에 우수한 효소의 안정성을 유지할 수 있다.

<20> 또한 본 발명에서 제조한 효소 안정화 마이크로캡슐은 제약 및 화장품 조성에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

<21> 본 발명에서 적용 가능한 효소는 글루코오스옥시다아제, 크산틴옥시다아제, D-아미노산옥시다아제 등과 같은 산화환원효소류, 트랜스아미나아제, 핵소키나아제 등과 같은 전이효소류, 리파제, 아밀라아제, 펩신, 트립신, 우레아제, 아스파라기나아제, 파파인 등과 같은 가수분해효소류, 알도라아제, 푸마라아제, 펙틴리아제 등과 같은 리아제류, 락테이트 케탈 아이소메라아제, 락테이트 레세마아제, 유디피-디-글루코오스-4-에피메라

아제 등과 같은 이성질화효소류, 아스파르테이트암모니아니카아제, DNA 리가아제 등과 같은 합성효소류 등의 효소를 포함한다. 상기 효소들은 하나 또는 둘 이상을 혼합하여 사용하는 것이 가능하다.

<22> 본 발명에서는 고분자량 폴리올과 저분자량 폴리올을 혼합하여 사용한다. 저분자량 폴리올은 효소를 균일하게 분산시키고 캡슐 형성과정에서 캡슐외부로 유출되어 캡슐을 보다 효과적으로 형성시켜주는 템플레이트 역할을 수행한다. 사용 가능한 저분자량 폴리올은 1000g/mol 이하의 폴리에테르 형태의 고분자로서, 구체적으로는, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜과 그들의 공중합체 및 유도체들, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 글리세린 등을 포함하는 모든 저분자량의 알코올기를 포함하는 화합물이 해당된다. 사용량은 캡슐 총량 대비 0.1 ~ 70 중량%가 적절하다. 0.1 중량% 이하의 농도에서는 효소를 효과적으로 분산시키기가 어렵고, 70 중량% 이상의 농도에서는 최종 마이크로캡슐의 수율이 낮아지는 문제점이 있다.

<23> 고분자량 폴리올은 캡슐화 과정에서도 외상으로의 유출 없이 캡슐 내부에 존재하여 효소에 대하여 소수성 분배효과를 부여하고 효소가 소수성 고분자 내벽에 의하여 변성되는 것을 차단하는 역할을 한다. 폴리올류의 분자량이 증가할 경우 폴리올 사슬의 소수성 또한 비례하여 증가한다. 따라서, 이러한 고분자량 폴리올이 효소와 소수성 고분자 내벽에 효과적으로 위치하였을 경우 소수성 분배 효과에 의하여 효소를 효과적으로 보호할 수 있다. 이러한 소수성 분배 효과를 유도하기 위해서는 폴리올의 분자량이 충분히 높아야만 한다. 적절한 폴리올은 분자량이 1000g/mol 이상의 왁스형태의 폴리에테르 고분자로서, 구체적으로는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜과 그들의 공중합체 및 유도체들이 이에 해당한다. 사용량은 캡슐 총량 대비 0.1 ~ 90 중량%가 적절하다. 0.1 중

량% 이하의 농도에서는 효과적인 소수성 분배 효과를 기대하기 어렵고, 반면에 90 중량% 이상의 농도에서는 높은 함량으로 인한 경질 마이크로캡슐의 형성이 어렵다.

<24> 상기 과정 중, 마이크로캡슐의 벽제로 사용되는 고분자(고분자 벽제)는 생분해성 소수성 지방족 폴리에스테르로, 구체적으로는, 폴리-L-락트산, 폴리-D,L-글리콜산, 폴리-L-락트산-co-글리콜산, 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산, 폴리카프로락톤, 폴리발레로락톤, 폴리하이드록시 부티레이트, 폴리하이드록시발러레이트, 폴리오르터에스테르 및 이들의 단량체로부터 제조된 공중합체를 포함한다. 또한, 마이크로 캡슐의 벽제로 사용한 가능한 고분자로(고분자 벽제)는 폴리스티렌, 폴리 p- 또는 m-메틸스티렌, 폴리 p- 또는 m-에틸스티렌, 폴리 p- 또는 m-클로로스티렌, 폴리 p- 또는 m-클로로메틸스티렌, 폴리 스티렌설포닉 엑시드, 폴리 p- 또는 m- 또는 t-부톡시스티렌, 폴리 메틸(메타)아크릴레이트, 폴리에틸(메타)아크릴레이트, 폴리프로필(메타)아크릴레이트, 폴리n-부틸(메타)아크릴레이트, 폴리이소부틸(메타)아크릴레이트, 폴리t-부틸(메타)아크릴레이트, 폴리2-에틸헥실(메타)아크릴레이트, 폴리

n-옥틸(메타)아크릴레이트, 폴리라우틸(메타)아크릴레이트, 폴리스테아릴(메타)아크릴레이트, 폴리2-히드록시에틸(메타)아크릴레이트, 폴리에틸렌 글리콜(메타)아크릴레이트, 메톡시폴리에틸렌글리콜(메타)아크릴레이트, 폴리글리시딜(메타)아크릴레이트, 폴리디메틸아미노에틸(메타)아크릴레이트, 폴리디에틸아미노에틸(메타)아크릴레이트, 폴리비닐아세테이트, 폴리비닐프로피오네이트, 폴리비닐부티레이트, 폴리비닐에테르, 폴리알릴부틸에테르, 폴리알릴글리시딜에테르, 폴리(메타)아크릴산, 폴리말레인산과 같은 불포화카복시산, 폴리알킬(메타)아크릴아마이드, 폴리(메타)아크릴로니트릴 등을 포함하며, 이들은 혼용하여 사용할 수 있다. 이러한 고분자 벽체는 총 캡슐 함량 대비 1 ~ 99.99 중량%가 적절하다. 1 중량% 이하의 농도에서는 마이크로캡슐 형성이 어렵고, 99.99 중량% 이상의 농도에서는 효소의 함량이 너무 낮아 효과 발현이 어렵다.

<25> 마이크로캡슐 제조 중에 사용되는 용매는 선택되는 고분자와 유사한 용해도 파라미터를 지니는 모든 화합물로서, 구체적으로는, 헥산, 헵탄, 옥탄, 노난, 데칸 등과 같은 선형 알칸류, 부탄올, 선형 또는 가지형 펜탄올, 헥산올, 헵탄올, 옥탄올, 노난올, 데칸올 등과 같은 탄소수 4~10의 알콜류, n-헥실 아세테이트, 2-에틸헥실 아세테이트, 메틸올리에이트, 디부틸 세바케이트, 디부틸 아디베이트, 이부틸 카바메이트와 같은 탄소수 7 이상의 알킬 에스테르, 메틸이소부틸케톤, 이소부틸케톤과 같은 지방족 케톤, 벤젠, 톨루엔, o- 또는 p-크실렌과 같은 방향족 탄화수소, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 사염화탄소 등과 같은 염소화합물 등을 포함한다.

<26> 마이크로캡슐 제조에 사용하는 안정화제는 수상에 도입하여 캡슐의 분산 안정성을 향상시킬 수 있는 모든 수용성 고분자들로서, 아라빅(arabic), 트래거캔스(tragacanth), 카라야(karaya), 라치(larch), 가티(ghatti), 로커스트 빈(locust bean), 구아(guar),

아가(agar), 알지네이트(alginate), 카라기난(carrageenan), 퍼셀러랜(furcellaran), 펙틴(pectin), 젤라틴(gelatin), 스타치(starch) 및 그 유도체; 미생물 발효 합성법에 의하여 제조된 덱스트란(dextran), 잔탄 검(xanthan gum) 및 그 유도체; 및 라디칼 또는 개환중합법에 의하여 제조된 비닐고분자, 아크릴고분자, 폴리올 함유 공중합체 및 그 유도체를 포함하며, 이들 중에서 하나 이상을 선택하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 폴리비닐알콜을 사용할 수 있다. 상기 분산 안정화제는 마이크로캡슐 분산 수용액의 질량에 대하여 0.01%~30중량%를 첨가할 수 있다. 상기 농도 이하의 농도범위에서는 우수한 분산 안정성을 기대하지 어렵고, 그 이상의 농도범위에서는 겔화가 진행되어 마이크로캡슐의 제조공정을 진행하기가 어렵다.

<27> 이하 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명을 보다 더 구체적으로 설명하지만, 본 발명이 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.

<28> <실시예 1> 폴리에틸렌글리콜 함유 폴리카프로락톤 마이크로캡슐의 제조

<29> 분자량 400, 4000, 8000, 12000 g/mol의 폴리에틸렌글리콜을 각각 고분자 벽체인 폴리카프로락톤 (80000g/mol 분자량)과 1:1의 중량비로 용매인 메틸렌클로라이드에 넣고 실온 교반하여 완전 용해시킨다. 폴리에틸렌글리콜과 폴리카프로락톤은 메틸렌클로라이드에 대하여 15 중량% 도입한다. 제조된 각각의 용액을 다시 1%의 폴리비닐알콜(평균 겔화도 89%)이 녹아 있는 수용액에 넣고 기계식 호모게나이저를 이용하여 5000rpm에서 5분간 유화시킨다. 이 때, 폴리에틸렌글리콜/ 폴리카프로락톤/메틸렌클로라이드 용액은 수 상에서 30 중량%의 농도를 갖는다. 유화가 끝난 후, 유화액은 감압증발기로 옮겨 실온에

서 30분간 감압교반하여 용매인 메틸렌클로라이드를 완전 제거한다. 감압증발 공정이 끝난 후, 분산액은 여과지를 통과시켜 여과시켜 캡슐만 회수하고 물을 포함하는 모든 수용성 물질은 제거한다. 회수된 캡슐은 실온 감압 건조기에서 1일 동안 건조한다.

<30> <실시예 2> 폴리에틸렌글리콜 함유 폴리메틸메타크릴레이트 마이크로캡슐의 제조

<31> 분자량 400, 4000, 8000, 12000 g/mol의 폴리에틸렌글리콜을 각각 고분자 벽제인 폴리메틸메타크릴레이트(75000g/mol 분자량)와 1:1의 중량비로 용매인 메틸렌클로라이드에 넣고 실온 교반하여 완전 용해시킨다. 폴리에틸렌글리콜과 폴리메틸메타크릴레이트는 메틸렌클로라이드에 대하여 20 중량% 도입한다. 이하 과정은 실시예 1과 동일하게 진행하여 폴리에틸렌글리콜/폴리메틸메타크릴레이트 마이크로캡슐을 제조한다.

<32> <실시예 3> 폴리에틸렌글리콜 함유 폴리스티렌 마이크로캡슐의 제조

<33> 분자량 400, 4000, 8000, 12000 g/mol의 폴리에틸렌글리콜을 각각 고분자 벽제인 폴리스티렌 (100000g/mol 분자량)와 1:1의 중량비로 용매인 메틸렌클로라이드에 넣고 실온 교반하여 완전 용해시킨다. 폴리에틸렌글리콜과 폴리스티렌은 메틸렌클로라이드에 대하여 20 중량% 도입한다. 이하 과정은 실시예 1과 동일하게 진행하여 폴리에틸렌글리콜/폴리스티렌 마이크로캡슐을 제조한다.

<34> <실시예 4> 2중 폴리에틸렌글리콜 함유 폴리카프로락톤 마이크로캡슐의 제조

<35> 저분자량 폴리올인 분자량 400g/mol의 폴리에틸렌글리콜과 고분자량 폴리올인 8000 g/mol의 폴리에틸렌글리콜을 7:3, 5:5, 3:7의 중량비로 혼합하여 고분자 벽제와 용매로 이루어진 폴리카프로락톤/메틸렌클로라이드 고분자 용액에 도입한다. 이때 상기의 저분자량 및 고분자량 폴리에틸렌글리콜을 더한 중량과 고분자 벽제인 폴리카프로락톤의 중량은 동량을 사용한다. 또한 상기의 폴리에틸렌글리콜과 폴리카프로락톤은 용매인 메틸렌클로라이드에 대하여 20 중량% 도입한다. 이하 과정은 실시예 1과 동일하게 진행하여 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐을 제조한다.

<36> <실시예 5> 파파인 함유 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐의 제조

<37> 파파인을 모델 효소로 선정하여 사용한다. 파파인을 먼저 분자량 400 g/mol의 저분자량 폴리에틸렌글리콜에 분산시킨다. 이 때 파파인의 함량은 전체 캡슐 중량 대비 1, 3, 5 중량%로 각각 도입한다. 이어서, 분자량 8000g/mol의 고분자량 폴리에틸렌글리콜과 고분자 벽제인 폴리카프로락톤이 녹아있는 메틸렌클로라이드 수용액에 파파인/폴리에틸렌글리콜 분산체를 재분산시킨다. 본 과정에서 사용되는 성분들의 함량은 실시예 4의 조성을 따른다. 이하 과정은 실시예 1과 동일하게 진행하여 파파인 효소 함유 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐을 제조한다.

<38> <시험예 1> 폴리에틸렌글리콜/고분자 마이크로캡슐의 특성 분석

<39> 실시예 1-3에서 제조된 폴리에틸렌글리콜/고분자 마이크로캡슐의 캡슐형태를 광학현미경으로 관찰하였다. 도 1에 나타내었듯이 제조된 폴리에틸렌글리콜/고분자 마이크로

캡슐은 5 ~ 20mm의 평균입자크기를 지니는 구형체이다. 각각의 구형체는 내부에 폴리에틸렌글리콜 도메인을 형성하고 있다. 하지만, 도입되는 폴리에틸렌글리콜의 함량은 분자량에 의존하는 결과를 나타내었다. 폴리에틸렌글리콜 분자량에 따른 고분자 마이크로캡슐 내 도입량 효과를 박층크로마토그래피 (Thin layer chromatography)를 이용하여 정량적으로 분석하여 표 1에 정리하였다.

<40> 【표 1】

	폴리에틸렌글리콜 도입량 (%)			
	400 g/mol	4000g/mol	8000g/mol	12000g/mol
실시예 1 조성	0	0.5	14	21
실시예 2 조성	0	0.7	18	20
실시예 3 조성	0	0.3	9	16

<41> 표 1에서 알 수 있듯이 폴리에틸렌글리콜 도입량은 분자량에 크게 의존하였다. 분자량이 증가할수록 폴리에틸렌글리콜 분자의 극성도가 감소하면서 도입량이 증가하는 결과를 얻었다. 그러나, 광학현미경 사진에서는 저분자량의 폴리에틸렌글리콜을 이용할 경우에도 내부에 도메인을 형성하는 결과를 얻었다. 이러한 마이크로캡슐 형성 거동은 폴리에틸렌글리콜이 용매의 제거 과정 중 캡슐 내부에서 상분리되어 특정 도메인을 형성하였다가 서서히 다시 캡슐 외부로 유출되기 때문이다. 이러한 저분자량의 폴리에틸렌글리콜의 거동은 캡슐 형성 과정 중 내부 도메인 형성을 유도하는 템플레이트 기능을 하는 것으로 판단된다. 고분자량의 폴리에틸렌글리콜은 공정에 상관없이 내부에 우수한 담지 결과를 보였다.

<42> <시험예 2> 폴리에틸렌글리콜 혼합비에 따른 함량 분석

<43> 폴리에틸렌글리콜 혼합비에 따른 캡슐 내 함유 거동을 확인하기 위하여 실시예 4에서 제조된 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐을 박층크로마코그래피를 이용하여 정량 분석하여 그 결과를 표 2에 정리하였다. 폴리에틸렌글리콜 캡슐 내 도입량은 혼합비에 따라 검출되었다. 하지만, 도 2의 광학현미경 사진 분석에서는 캡슐 형태는 혼합비에 상관없이 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 저분자량의 폴리에틸렌글리콜은 캡슐 내부에서 도메인 형성을 위한 템플레이트 역할을 하고 고분자량의 폴리에틸렌글리콜은 그 템플레이트에 그대로 남아 있음을 의미한다.

<44> 【표 2】

혼합비 400 g/mol : 8000 g/mol	폴리에틸렌글리콜 도입량 (%)	
	400 g/mol	8000 g/mol
10 : 0	0	0
7 : 3	0	4
5 : 5	0	6.5
3 : 7	0	9.5
0 : 10	0	14

<45> <시험예 3> 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 캡슐 내 파파인 도입량 분석

<46> 실시예 5에서 제조된 파파인 함유 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐의 광학현미경 사진을 도 3에 나타내었다. 도 1과는 달리 제조된 마이크로캡슐 내부에 파파인 영역을 쉽게 관찰할 수 있다. 도 4에는 파파인 함유 마이크로캡슐의 주사전자현미경 사진을 나타내었다. 캡슐 외벽은 매끄러운 폴리카프로락톤으로 형성되어 있고 파파인 또는 폴리에틸렌글리콜의 캡슐 외부로의 유출은 전혀 관찰되지 않아, 파파인과 폴리에틸렌글리콜이 폴리카프로락톤 벽체에 의하여 효과적으로 포집되어 있음을 알 수 있다. 마이크로캡슐 내 파파인의 도입량은 다음과 같이 분석하였다. 먼저 파파인 함유 마이크로캡슐 50ml을 디메틸설폭사이드 1ml에 넣고 1시간 동안 인규베이션한 후, 0.05% 소듐도

데실설페이트/0.01N 소듐하이드록사이드 용액 2ml를 첨가해 실온에서 1시간 방치해서 고분자와 효소를 완전 녹인다. 이어서 마이크로-BCA를 이용하여 단백질 정량한다. 이러한 분석법으로 정량 분석한 파파인 함량은 다음 표 3에 나타내었다. 표 3에서 알 수 있듯이, 본 발명에서 제안하는 방법은 효소를 효과적으로 포집함을 잘 나타내고 있다.

<47> 【표 3】

파파인 도입량 (중량%, 계산치)	파파인 도입량 (중량%, 측정치)	도입율 (%)
1	0.99	99
3	2.79	93
5	4.55	91

<48> <시험예 4> 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 캡슐 내 파파인 안정도 분석

<49> 실시예 5에서 제조된 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐 내에서 파파인의 활성도를 저장 온도에 따라 확인하였다. 본 경우에는 파파인 3% 함유 마이크로캡슐을 선택하여 활성도를 측정하였다. 캡슐 내 파파인의 활성도는 다음과 같이 분석하였다. 아세톤 1ml에 파파인 함유 마이크로 캡슐 20ml을 넣고 10초간 초음파를 주사하였다. 이어서, 12000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복하여 순수 효소만을 얻었다. 얻어진 순수 효소는 카제인을 기질로 280nm에서 UV 흡광기를 이용하여 활성도를 측정하였다. 저장 조건에 따라 얻어진 파파인의 활성도를 다음 표 4에 나타내었다. 제조된 파파인 함유 폴리에틸렌글리콜/폴리카프로락톤 마이크로캡슐은 장기 저장 조건에서도 우수한 활성도를 나타내었다. 이러한 우수한 활성도는 폴리에틸렌글리콜과 같은 폴리올이 마이크로캡슐 내에서 고체형태의 효소를 효과적으로 안정화한다는 것을 의미한다. 효소와 폴리카프로락톤과 같은 고분자 벽체 사이에 폴리올이 적절하게 위치하여 소수성 분

배 효과를 부여함으로써 효소와 고분자 간의 직접적인 상호작용을 차단하여 결과적으로 효소의 안정도를 향상시키는 것으로 해석된다.

<50> 【표 4】

저장 시간	건조 상태		젖음 상태	
	실온	40 ℃	실온	40 ℃
제조 후	100	100	100	100
2주 후	97 _{±3}	92 _{±4}	93 _{±5}	89 _{±5}
4주 후	95 _{±4}	91 _{±2}	90 _{±3}	82 _{±4}

【발명의 효과】

<51> 이상에서 상술한 바와 같이, 폴리올/고분자 마이크로캡슐은 내부에 효소성분을 효과적으로 도입할 수 있는 시스템이다. 특히, 폴리올의 분자량을 적절히 조절하여 캡슐 형성 중 템플레이트 역할과 효소 성분 도입 후 효소와 소수성 고분자 벽체 사이에서 소수성 분배 효과를 부여하여 효소의 변성을 막을 수 있다는 면에서 큰 의미를 찾을 수 있다. 또한, 제조된 효소함유 폴리올/고분자 마이크로캡슐은 담지 효소에 대한 우수한 안정도를 부여하여 실질적인 응용에 있어서 효소의 활용도를 더욱 높일 것으로 기대된다. 특히, 효소를 촉매로 사용하는 다양한 바이오엔지니어링 분야에서 반응 제어 시스템으로 활용 가능하고 효소를 분해 촉매로 사용하는 피부과학 분야에서는 각질 케어 및 타 유효 성분 피부 흡수 가속화제로 의미 있게 활용될 것으로 기대된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

- (가) 저분자량 폴리올 및 고분자량 폴리올을 혼합하여 고분자 용액에 용해시키는 단계;
- (나) 상기의 폴리올이 용해된 용액을 안정화제가 도입된 수용액에 넣고 유화시키는 단계;
- (다) 상기 유화액을 감압증발기에서 감압교반하여 용매를 제거하는 단계;
- (라) 용매를 제거한 분산액을 여과하여 수용성 물질은 모두 제거하여 캡슐을 회수하는 단계; 및
- (마) 회수된 상기 캡슐을 실온 감압 건조기에서 건조하여 폴리올/고분자 마이크로캡슐을 얻는 단계;를 포함하며, 상기 (가) 단계의 고분자 용액은 용매에 고분자 벽제(벽제용 고분자)를 용해하여 제조하는 것을 특징으로 하는 폴리올/고분자 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 저분자량 폴리올 및 고분자량 폴리올을 합한 중량과 고분자 벽제의 중량이 동량이 되는 것을 특징으로 하는 폴리올/고분자 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 저분자량 폴리올과 고분자량 폴리올을 더한 중량 및 고분자 벽제의 중량은 각각 용매에 대하여 20 중량%인 것을 특징으로 하는 폴리올/고분자 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 (나)단계의 안정화제는 아라빅(arabic), 트래거캔스(tragacanth), 카라야(karaya), 라치(larch), 가티(ghatti), 로커스트 빈(locust bean), 구아(guar), 아가(agar), 알지네이트(alginate), 카라기난(carrageenan), 퍼셀러랜(furcellaran), 펙틴(pectin), 젤라틴(gelatin), 스타치(starch) 및 그 유도체; 미생물 발효 합성법에 의하여 제조된 덱스트란(dextran), 잔탄 검(xanthan gum) 및 그 유도체; 및 라디칼 또는 개환중합법에 의하여 제조된 비닐고분자, 아크릴고분자, 폴리올 함유 공중합체 및 그 유도체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 폴리올/고분자 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 (나)단계의 안정화제는 마이크로 캡슐 분산 수용액의 질량에 대하여 0.01 ~ 30 중량%인 것을 특징으로 하는 폴리올/고분자 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 6】

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 의한 제조 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 폴리올/고분자 마이크로캡슐.

【청구항 7】

제 6항의 폴리올/고분자 마이크로캡슐을 이용하여 효소 또는 단백질을 포집하는 것을 특징으로 하는 효소 또는 단백질의 안정화 방법.

【청구항 8】

(가) 효소를 저분자량 폴리올에 균일하게 분산시키는 단계;

(나) 상기 안정화된 효소/폴리올을 고분자 용액에서 재분산 시키고 이어서 유화과정을 거쳐 에멀전을 수득하는 단계; 및

(다) 효소/폴리올/고분자 용액을 고화시켜 경질 고분자 마이크로캡슐로 회수하는 단계;를 포함하며 상기 (나) 단계의 고분자 용액은 용매에 고분자량 폴리올 및 고분자 벽제(벽제용 고분자)를 용해하여 제조하는 것을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로 캡슐의 제조 방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기의 제조 방법으로 제조된 효소 안정화 마이크로 캡슐.

【청구항 10】

제 8항에 있어서, 상기 효소는 산화환원효소류, 전이효소류, 가수분해효소류, 리아제류, 이성질화효소류 및 리가아제류로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 11】

제 8항에 있어서, 상기 저분자량 폴리올은 1000g/mol 이하의 폴리에테르 형태로서 마이크로캡슐 형성 중에 템플레이트 역할을 하고 효소의 분산매 역할을 하는 것을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조방법.

【청구항 12】

제 8항에 있어서, 상기의 저분자량 폴리올은 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜과 그들의 공중합체 및 유도체들, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 글리세린으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조방법.

【청구항 13】

제 8항에 있어서, 상기 저분자량 폴리올은 캡슐 총량에 대하여 0.1 ~ 70 중량%인 것을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 14】

제 8항에 있어서, 상기 고분자량 폴리올은 1000g/mol 이상의 폴리에테르 형태로서 마이크로캡슐 내부에 존재하여 효소에 대하여 소수성 분배 효과를 부여하고 벽체를 형성하는 고분자의 내벽에 의한 변성을 차단하는 역할을 하는 것을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 15】

제 8항에 있어서, 상기 고분자량 폴리올은 폴리에틸렌글리콜과 폴리프로필렌글리콜, 이들의 공중합체 및 유도체들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 16】

제 8항에 있어서, 상기 고분자량 폴리올은 캡슐 총량에 대하여 0.1 ~ 90 중량%인 것을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 17】

제 8항에 있어서, 상기 고분자 벽제(벽제용 고분자)는 마이크로캡슐의 벽제를 형성하는 것임을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 18】

제 8항에 있어서, 상기 고분자 벽제(벽제용 고분자)는 폴리에스테르, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐에테르, 불포화카르복시산, 이들의 공중합체 및 유도체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 19】

제 8항에 있어서, 상기 고분자 벽제(벽제용 고분자)는 캡슐 총량에 대하여 1 ~ 99.99 중량%인 것을 특징으로 하는 효소 안정화 마이크로캡슐의 제조 방법.

【청구항 20】

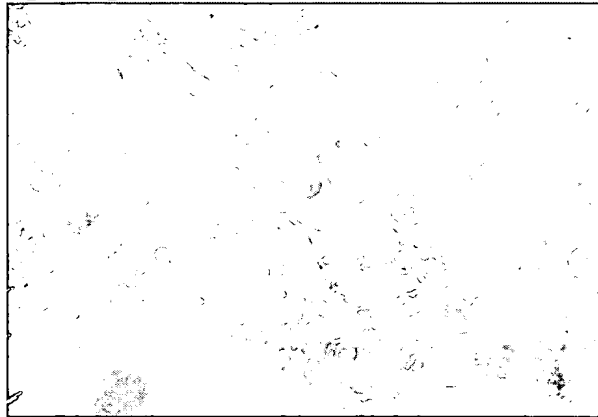
내부 핵으로 효소;

상기 효소의 코팅 물질로 소수성의 고분자량 폴리올;

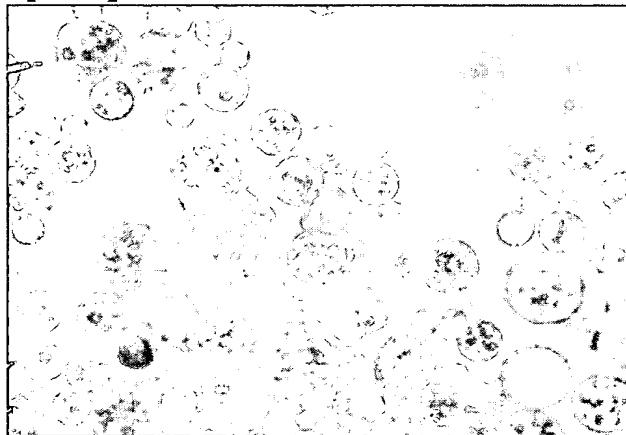
최외각에 고분자가 벽제;로 이루어진 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 삼중 구조의 마이크로캡슐.

【도면】

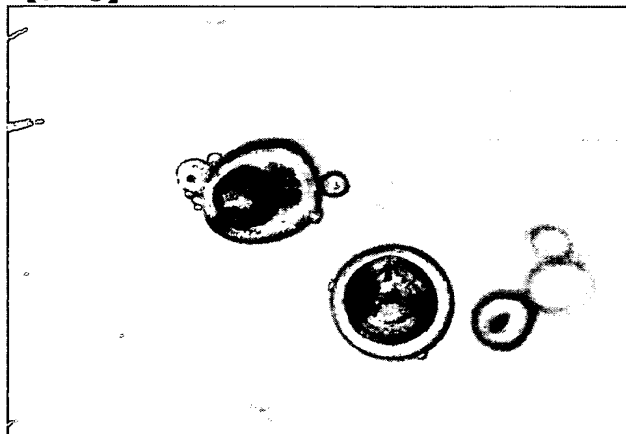
【도 1】



【도 2】

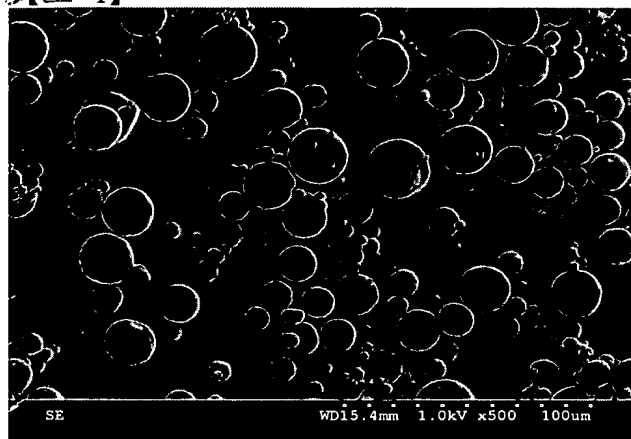


【도 3】



BEST AVAILABLE COPY

【도 4】



BEST AVAILABLE COPY